



(12)

CERERE DE BREVET DE INVENȚIE

(21) Nr. cerere: **a 2011 01273**

(22) Data de depozit: **29.11.2011**

(41) Data publicării cererii:
30.08.2013 BOPI nr. **8/2013**

(71) Solicitant:
• **UNIVERSITATEA DE MEDICINĂ ȘI FARMACIE "CAROL DAVILA" DIN BUCUREȘTI, STR.DIONISIE LUPU NR.37, SECTOR 1, BUCUREȘTI, B, RO**

(72) Inventatori:
• **ANDRIEȘ ADRIAN, BD. ION MIHALACHE NR.111, BL. 12A, SC. B, AP. 61, SECTOR 1, BUCUREȘTI, B, RO;**
• **NIȚĂ SULTANA, STR.BĂRBAT VOIEVOD NR.21, SECTOR 2, BUCUREȘTI, B, RO;**
• **RĂDULESCU FLAVIAN ȘTEFAN, STR. ANASTASIE PANU NR.23, BL.D6, SC.2, AP.61, SECTOR 3, BUCUREȘTI, B, RO;**

• **LUPULEASA DUMITRU, STR. GENERAL CULCER ION NR.28A, SECTOR 6, BUCUREȘTI, B, RO;**
• **MITU MIRELA ADRIANA, BD.UNIRII NR.78, BL.J2, SC.3, AP.65, SECTOR 3, BUCUREȘTI, B, RO;**
• **PATRON LUMINIȚA ILEANA, STR.DIMITRIE MARINESCU NR.1A, B1, ET.7, SECTOR 2, BUCUREȘTI, B, RO;**
• **PANTELI IRINA MINERVA, STR. SPĂTARU NICOLAE MILESCU NR. 46-48, SECTOR 2, BUCUREȘTI, B, RO;**
• **RASIT IUKSEL, BD.DINICU GOLESCU NR.37, BL.4, SC.B, ET.1, AP.40, SECTOR 1, BUCUREȘTI, B, RO**

(54) **ASOCIEREA COMPLEXILOR COBALTULUI ȘI CUPRULUI CU LIGANZI ORGANICI DE TIP OXICAMI ÎN TERAPIA ANTIINFLAMATOARE CU ADMINISTRARE LOCALĂ**

(57) Rezumat:

Invenția se referă la un produs farmaceutic, utilizat în dermatologie. Produsul conform invenției este pe bază de compuși macromoleculari, hidrofilii, de tip derivați poliacrilici, conținând 0,01...10% asocieri de complexi ai cobaltului și cuprului cu oxicami ca agenți

antiinflamatori nesteroidieni, 1...5% agenți tensioactivi neionici, 1...10% promotori de absorbție lipofili și 5...20% componente alcoolice volatile.

Revendicări: 1



Asocierea complexilor cobaltului și cuprului cu liganzi organici de tip oxicami în terapia antiinflamatoare cu administrare locală

Invenția de față se referă la forme farmaceutice semisolide de tip gel-emulsie, constituite pe baza unor compuși macromoleculari hidrofilii de tip poli-acrilat, destinate administrării locale la nivelul pielii și al mucoaselor, conținând asocieri de complecși ai cobaltului și cuprului cu agenți antiinflamatori nesteroidieni de tip oxicami (0.01-10%). Compuși organometalici utilizați ca asociere în cadrul formulelor care fac obiectul prezentei cereri de brevet au următoarele formule:

$[\text{Co} \cdot (\text{C}_{15}\text{H}_{12}\text{N}_3\text{O}_4\text{S})_2 \cdot (\text{H}_2\text{O})_2]$ și $[\text{Cu} \cdot (\text{C}_{15}\text{H}_{12}\text{N}_3\text{O}_4\text{S})_2 \cdot (\text{H}_2\text{O})_2]$, notate în continuare Piroxicam-Co, respectiv Piroxicam-Cu;

$[\text{Co} \cdot (\text{C}_{14}\text{H}_{12}\text{N}_3\text{O}_4\text{S}_2)_2 \cdot (\text{H}_2\text{O})_2]$ și $[\text{Cu} \cdot (\text{C}_{14}\text{H}_{12}\text{N}_3\text{O}_4\text{S}_2)_2 \cdot (\text{H}_2\text{O})_2]$, notate în continuare Meloxicam-Co, respectiv Meloxicam-Cu.

Disponibilitatea în creștere a agenților antiinflamatori steroidieni și dezvoltarea unor noi serii de compuși anti-inflamatori nesteroidieni (AINS), debutând în anii 1950, a redus interesul pentru dezvoltarea unor formulări farmaceutice care să permită, prin profilul farmacocinetic și farmacodinamic al complexului organo-metalic conținut, reducerea incidenței și intensității reacțiilor adverse tipice AINS.

Aplicarea diferitelor modele de simulare-modelare in silico de către grupul de cercetători care au înaintat prezenta cerere de brevet de invenție a orientat cercetările pentru obținerea unor compuși cu activitate antiinflamatoare din familia oxicamilor (piroxicam, meloxicam) cu metale tranziționale.

Predicția in silico, bazată pe diferite ipoteze de calcul, a condus la o ierarhizare a compușilor din clasa oxicamilor, în urma căreia piroxicamul și meloxicamul au fost desemnați drept cei mai buni candidați pentru obținerea de derivați cu activitate antiinflamatoare. De asemenea, tehnicile in silico au permis conturarea unei ipoteze de potentare prin complexarea cu metale tranziționale.

În continuare, o serie de complecși cu metale tranziționale ai acestor două structuri de bază au fost testate in vitro, atât în ceea ce privește citotoxicitatea, cât și activitatea specifică, antiinflamatoare.

Studiile in vitro au permis demonstrarea experimentală a modificărilor de citotoxicitate și activitate antiinflamatorie. Experimentele proprii au condus la rezultate care probează activitatea antiinflamatoare, dar efectele antiinflamatorii



exprimate diferit. Astfel, utilizarea ca biomarker a IL1-beta conduce la o clasificare: Meloxicam-Co > Meloxicam-Cu > Meloxicam > Piroxicam-Co > Piroxicam-Cu > Piroxicam, în timp ce, atât pentru TNF alfa, cât și pentru IL-8 utilizați ca biomarkeri, rezultă clasificarea Piroxicam Co > Piroxicam-Cu > Piroxicam > Meloxicam-Co > Meloxicam-Cu > Meloxicam.

Apariția unor clasificări distincte sugerează existența unor deosebiri de mecanism de acțiune pentru meloxicam și piroxicam în raport cu secreția de citokine. Această constatare a conturat ideea beneficiilor unei posibile asocieri ale complexilor generați de același cation metalic cu diferiți liganzi organici de tip oxicami cu activitate antiinflamatoare.

În cererea de brevet de invenție nr. A/01050/2010 au fost menționate forme farmaceutice cu administrare locală, semisolidă, conținând ca substanțe active complecși ai cuprului cu meloxicam și piroxicam, sub forma unor sisteme de tip gel hidrofil. Experimentarea preclinică a demonstrat ca utilizarea cobaltului [Nita S. și col. - Cerere de brevet nr. A/01061/2010] a condus la cea mai semnificativă potențare a efectelor antiinflamatorii, pentru ambii liganzi carboxamid-enolici.

Prezenta cerere de brevet de invenție se referă la forme farmaceutice semisolidă de tip gel-emulsie conținând asocieri de complecși ai cobaltului sau cuprului cu agenți antiinflamatori nesteroidieni de tip oxicami (0.01-10%).

Combinarea unei rețele hidrofile cu agenți tensioactivi neionici și cu promotori de absorbție lipofili de tipul izopropil-miristatului, asociat sau nu cu componente lipidice biocompatibile, generează sisteme semisolidă bifazice, cu un necesar minim de componente alcoolice volatile. Se asigură astfel o dispersie adecvată a principiilor active (asociere piroxicam cobalt și piroxicam cupru, respectiv meloxicam cobalt și meloxicam cupru) în cadrul formulării farmaceutice duale.

Formulările descrise includ agenți de stabilizare de tip tensioactiv neionic (de exemplu macrogol-glicerol ricinoleat, 1-5%) necesari menținerii substanței active în soluție sau pentru stabilizarea dispersiei (dependent de concentrație), precum și promotori de absorbție lipofili de tip izopropil-miristat (1-10%), în prezența unor componente alcoolice volatile în cantități reduse (5-20%).



Compoziția generală a formulărilor de tip gel-emulsie este redată în continuare:

Component	Cantitate (g/100g)
Complex al cobaltului cu ligand piroxicam	0.01 - 10.0
Complex al cobaltului cu ligand meloxicam	0.01 - 10.0
Agent macromolecular poliacrilic	0.5 - 4.0
Trietanolamină	ad pH 7
Propilenglicol	1.0 - 10.0
Promotor de absorbție lipofil de tip izopropil-miristat sau combinații ale acestuia cu acizi grași și alte componente lipidice biocompatibile	1.0 - 10.0
Agent de solubilizare nonionic de tip macrogol-glicerol ricinoleat	1.0 - 5.0
Etanol absolut	5.0 - 20.0
Apa purificată	ad 100.0

Modul de preparare

Formatorul de rețea de tip poliacrilat (de exemplu carbomer 934, 940) este hidratat, timp de 24 de ore, în 75% din cantitatea de apă prevăzută în formulă. Pentru acest sistem poliacrilic, structurarea gelului s-a realizat prin neutralizare cu trietanol-amina.

Gelurile rezultate sunt neutralizate, prin adăugare agentului de neutralizare.

Asocierea de complecși organometalici se dizolvă sau se dispersează în amestecul de propilenglicol și etanol, în care a fost dispersat anterior tensioactivul neionic și ulterior, promotorul de absorbție lipofil.

Gelul neutralizat și sistemul micelar conținând asocierea de complecși organometalici ai aceleiași oxicam se reunesc și se omogenizează prin agitare lentă.



Exemplul 1

Component	Cantitate (g/100g)
Complex al cobaltului cu ligand piroxicam	0.05
Complex al cuprului cu ligand piroxicam	0.05
Carbomer 940	1
Trietanolamină	ad pH 7
Propilenglicol	5
Izopropil-miristat	5
Agent de solubilizare nonionic de tip macrogol-glicerol ricinoleat	2
Etanol absolut	10
Apa purificată până la	100

Exemplul 2

Component	Cantitate (g/100g)
Complex al cobaltului cu ligand piroxicam	0.05
Complex al cuprului cu ligand piroxicam	0.05
Carbomer 940	1
Trietanolamină	ad pH 7
Propilenglicol	5
Amestec izopropil-miristat, lanolină și acid oleic	5
Agent de solubilizare nonionic de tip macrogol-glicerol ricinoleat	2
Etanol absolut	10
Apa purificată până la	100



[Signature]

Exemplul 3

Component	Cantitate (g/100g)
Complex al cobaltului cu ligand piroxicam	0.1
Complex al cuprului cu ligand piroxicam	0.1
Carbomer 940	1
Trietanolamină	ad pH 7
Propilenglicol	5
Izopropil-miristat	5
Agent de solubilizare nonionic de tip macrogol-glicerol ricinoleat	2
Etanol absolut	10
Apa purificată până la	100

Exemplul 4

Component	Cantitate (g/100g)
Complex al cobaltului cu ligand piroxicam	0.1
Complex al cuprului cu ligand piroxicam	0.1
Carbomer 940	1
Trietanolamină	ad pH 7
Propilenglicol	5
Amestec izopropil-miristat, lanolină și acid oleic	5
Agent de solubilizare nonionic de tip macrogol-glicerol ricinoleat	2
Etanol absolut	10
Apa purificată până la	100

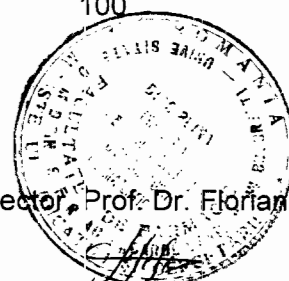


Exemplul 5

Component	Cantitate (g/100g)
Complex al cobaltului cu ligand piroxicam	0.29
Complex al cuprului cu ligand piroxicam	0.28
Carbomer 940	1
Trietanolamină	ad pH 7
Propilenglicol	5
Amestec izopropil-miristat, lanolină și acid oleic	5
Agent de solubilizare nonionic de tip macrogol-glicerol ricinoleat	2
Etanol absolut	10
Apa purificată până la	100

Exemplul 6

Component	Cantitate (g/100g)
Complex al cobaltului cu ligand piroxicam	0.57
Complex al cuprului cu ligand piroxicam	0.57
Carbomer 940	1
Trietanolamină	ad pH 7
Propilenglicol	5
Amestec izopropil-miristat, lanolină și acid oleic	5
Agent de solubilizare nonionic de tip macrogol-glicerol ricinoleat	2
Etanol absolut	10
Apa purificată până la	100



Exemplul 7

Component	Cantitate (g/100g)
Complex al cobaltului cu ligand meloxicam	0.05
Complex al cuprului cu ligand meloxicam	0.05
Carbomer 940	1
Trietanolamină	ad pH 7
Propilenglicol	5
Izopropil-miristat	5
Agent de solubilizare nonionic de tip macrogol-glicerol ricinoleat	2
Etanol absolut	10
Apa purificată până la	100

Exemplul 8

Component	Cantitate (g/100g)
Complex al cobaltului cu ligand meloxicam	0.05
Complex al cuprului cu ligand meloxicam	0.05
Carbomer 940	1
Trietanolamină	ad pH 7
Propilenglicol	5
Amestec izopropil-miristat, lanolină și acid oleic	5
Agent de solubilizare nonionic de tip macrogol-glicerol ricinoleat	2
Etanol absolut	10
Apa purificată până la	100

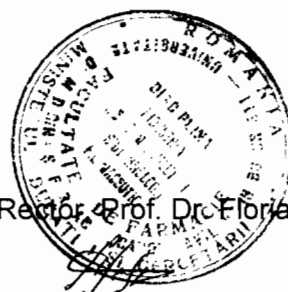


Exemplul 9

Component	Cantitate (g/100g)
Complex al cobaltului cu ligand meloxicam	0.1
Complex al cuprului cu ligand meloxicam	0.1
Carbomer 940	1
Trietanolamină	ad pH 7
Propilenglicol	5
Izopropil-miristat	5
Agent de solubilizare nonionic de tip macrogol-glicerol ricinoleat	2
Etanol absolut	10
Apa purificată până la	100

Exemplul 10

Component	Cantitate (g/100g)
Complex al cobaltului cu ligand meloxicam	0.1
Complex al cuprului cu ligand meloxicam	0.1
Carbomer 940	1
Trietanolamină	ad pH 7
Propilenglicol	5
Amestec izopropil-miristat, lanolină și acid oleic	5
Agent de solubilizare nonionic de tip macrogol-glicerol ricinoleat	2
Etanol absolut	10
Apa purificată până la	100

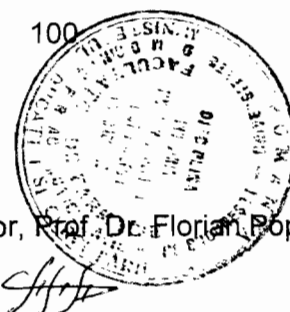


Exemplul 11

Component	Cantitate (g/100g)
Complex al cobaltului cu ligand meloxicam	0.29
Complex al cuprului cu ligand meloxicam	0.28
Carbomer 940	1
Trietanolamină	ad pH 7
Propilenglicol	5
Amestec izopropil-miristat, lanolină și acid oleic	5
Agent de solubilizare nonionic de tip macrogol-glicerol ricinoleat	2
Etanol absolut	10
Apa purificată până la	100

Exemplul 12

Component	Cantitate (g/100g)
Complex al cobaltului cu ligand meloxicam	0.57
Complex al cuprului cu ligand meloxicam	0.57
Carbomer 940	1
Trietanolamină	ad pH 7
Propilenglicol	5
Amestec izopropil-miristat, lanolină și acid oleic	5
Agent de solubilizare nonionic de tip macrogol-glicerol ricinoleat	2
Etanol absolut	10
Apa purificată până la	100



Testarea *in vivo* a acțiunii antiinflamatoare

Dintre numeroasele metode utilizate în screeningul efectelor antiinflamatoare ale diverselor medicamente, cea mai frecvent utilizată este metoda de evidențiere a efectului de inhibiție a edemului produs la nivelul labei posterioare de șobolan după injectarea unui produs flogistic. Ca agent flogistic (iritant) a fost utilizată o soluție carrageenan. Efectul a fost măsurat prin metoda pletismometriei computerizate, metodă unanim utilizată în prezent în testarea efectului antiinflamator sistemic.

Pentru studiu activității *in vivo* a produselor semisolide de tip gel-emulsie conținând asocieri ale complexilor organometalici, au fost utilizați șobolani Wistar, de ambe sexe, cu greutate de 150 - 200g furnizați de Biobaza Institutului Cantacuzino, însoțiți de certificat de sănătate. S-au constituit loturi cu număr egal de animale pentru fiecare probă de testat sau produs de referință.

Activitatea de utilizare și întreținere a animalelor de laborator în cadrul Vivariului INCDCF se face în condițiile respectării prevederilor și reglementărilor din domeniu emise de FELASA (Federation of European Laboratory Animal Science Associations) și preluate de ARSAL (Asociația Română pentru Știința Animalelor de Laborator), aflate în vigoare.

Animalele au fost cazate în cuști corespunzătoare, în grupuri mici, de același sex. Temperatura camerei experimentale a fost de $22 \pm 2^\circ\text{C}$ și umiditatea relativă de 50-60%. Iluminarea s-a realizat artificial, alternativ 12 ore lumină/12 ore întuneric.

Animalele au fost verificate la recepție și ținute pe o perioadă de 7 zile pentru aclimatizare în vivariul ICCF, cu observarea stării clinice, a comportamentului și consumului de hrană. Au fost cântărite la recepție și după perioada de aclimatizare, cu selecționarea pentru test a animalelor sănătoase cu variații ponderale mai mici de 10% din greutatea inițială.

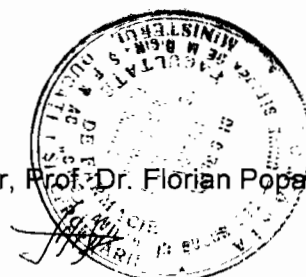
Animalele au primit o hrană standardizată și apă *ad libitum*.

Animalele au fost grupate pentru a constitui loturi egale, omogene pentru fiecare probă test și loturi martor.

Probe de testat

Probele sub formă de geluri supuse testării au fost următoarele:

- Exemplul 9;
- Exemplul 10;
- Exemplul 11.



Produse de referință

Pentru comparații au fost alese preparatele farmaceutice comerciale:

- Piroxicam gel 0,5 %, Antibiotice SA, România, notat Referinta 1;
- Fastum gel, A.MENARINI Manufacturing Logistics and Services S., ITALIA, notat Referinta 2.

Măsurarea volumelor segmentelor cu inflamație provocată și evoluția lor ulterioară a fost realizată cu ajutorul unui pletismometru 7140 computerizat Ugo Basile - Italia și a programului soft dedicat CUB pentru achiziția și stocarea de date.

Probele de testat și substanțele de referință au fost administrate pe cale epicutană cu 5 minute înaintea injectării substanței cu efect flogistic.

Ca agent flogistic a fost utilizată o soluție de carrageenan 1% în ser fiziologic (*Carrageenan from seaweed, SIGMA-ALDRICH, USA*). Animalele au fost supuse injectării plantare subaponevrotice la nivelul membrului posterior drept cu un volum de 0,1 ml din soluția de agent flogistic.

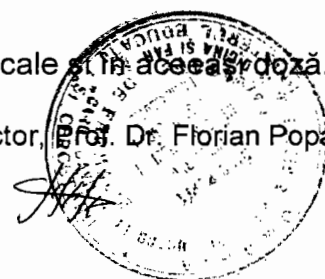
În scopul stabilirii intervalului optim între momentul tratamentului și cel al administrării agentului proinflamator s-au efectuat trei administrări de proba de referință la intervale diferite de timp (2 ore, 1 oră, imediată) anterioare injectării soluției de carrageenan.

Volumul membrului posterior drept, a fost măsurat pletismometric anterior aplicării tratamentului și injectării cu agent flogistic, acesta reprezentând momentul „0” al măsurărilor. Volumul extremității a fost măsurat imediat după tratament și injectare momentul „1”, apoi la 60, 120, 180 minute și la 24 ore (momentele „2”, „3”, „4”, „5”).

În vederea efectuării citirilor, extremitatea inflamată a fost marcată vizual la nivelul maleolei laterale, apoi a fost introdus în lichidul de imersie al celulei de măsurare a aparatului până la acest nivel, cu efectuarea a câte 4 măsurători pentru fiecare animal și pentru fiecare moment stabilit conform protocolului de lucru, cu stocarea datelor prin intermediul softului pletismometrului.

Probele de testat au fost administrate ca atare prin aplicare la nivelul feței plantare a piciorului drept al animalelor, în cantitate de 4 g, prin masare blândă repetată (de 50 de ori) pentru facilitarea absorbției cutanate.

Produsele de referință a fost administrate pe aceeași cale și în aceeași doză.



21

Animalele din lotul martor alb au primit agentul flogistic fără vreun alt tratament.

S-au calculat valorile medii ale volumelor măsurate pentru fiecare animal și moment de măsurare, valorile medii pe loturi, deviația standard.

Pentru fiecare lot, creșterea volumului extremității inflamate la fiecare moment de măsurare a fost exprimată procentual comparativ cu volumul inițial (momentul „0”), corespunzător formulei.

Pentru fiecare moment de măsurare, au fost calculate variațiile între mediile valorilor obținute la loturile tratate și cele ale loturilor martor (cu sau fără tratament), conform unei formule matematice, fiind astfel evaluat efectul antiinflamator procentual.

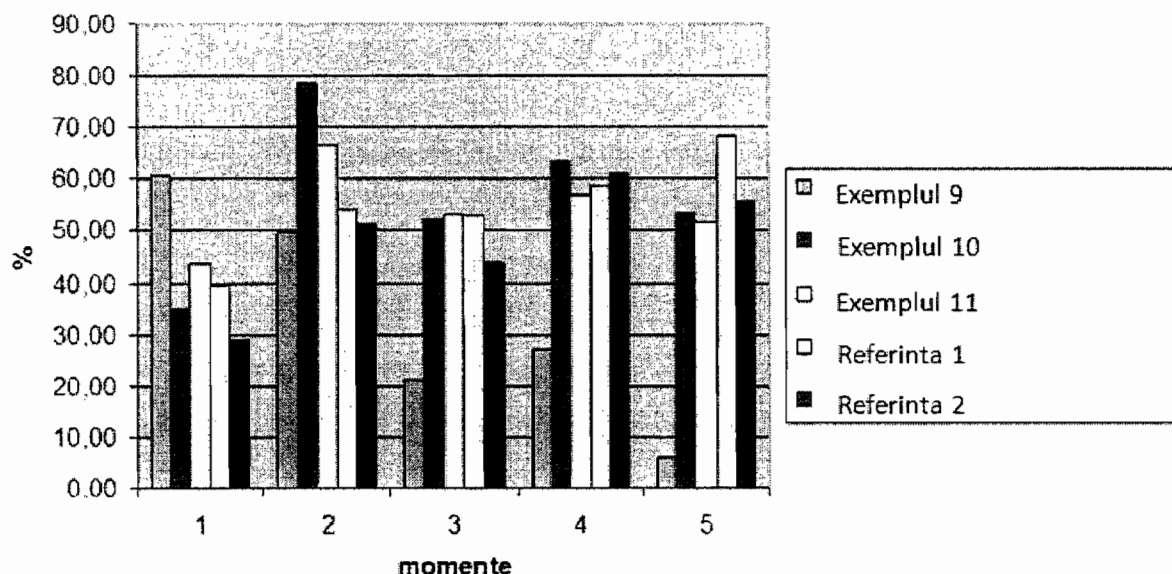


Figura 1. Acțiunea antiinflamatoare a formulărilor semisolide conținând asocieri de complecși organometalici ai cobaltului sau cuprului cu oxicami

Rezultatele sugerează o instalare rapidă a acțiunii antiinflamatoare, pe anumite intervale de timp chiar superioară referințelor selectate. Totodată, se poate observa o contribuție semnificativă a promotorului de absorbție. Conținutul lipidic biocompatibil determină o accentuare a acțiunii emoliente locale, cu favorizarea concomitentă a difuziei prin bariera biologică.



Revendicări

1. Formă farmaceutică semisolidă, constituită pe baza unor compuși macromoleculari hidrofilii de tip derivați poliacrilici, destinate administrării locale pe piele și mucoase, caracterizată prin aceea că include asocieri de complecși ai cobaltului și cuprului cu agenți antiinflamatori nesteroidieni - oxicami ($[\text{Co} \cdot (\text{C}_{15}\text{H}_{12}\text{N}_3\text{O}_4\text{S})_2 \cdot (\text{H}_2\text{O})_2]$ și $[\text{Cu} \cdot (\text{C}_{15}\text{H}_{12}\text{N}_3\text{O}_4\text{S})_2 \cdot (\text{H}_2\text{O})_2]$, respectiv $[\text{Co} \cdot (\text{C}_{14}\text{H}_{12}\text{N}_3\text{O}_4\text{S}_2)_2 \cdot (\text{H}_2\text{O})_2]$ și $[\text{Cu} \cdot (\text{C}_{14}\text{H}_{12}\text{N}_3\text{O}_4\text{S}_2)_2 \cdot (\text{H}_2\text{O})_2]$, în concentrații ale componentelor individuale de 0.01-10%), agenți de tensioactivi neionici (1-5%), promotori de absorbție lipofili (1-10%) și componente alcoolice volatile (5-20%).

